

# 未発芽豆類の酸化還元系酵素活性への 貯蔵期間の影響

箕口重義・荒木裕子・久毛しげ子

## Influences of Storage Time on Oxidoreductase Activities in Ungerminated Beans

SHIGEYOSHI MUGUCHI, HIROKO ARAKI and SHIGEKU KUGE

豆、及び禾穀種実ではその鮮度が利用性と深くかわっており、ダイズ、アズキ、インゲンマメ、ササゲなどの豆類では古くなるにつれ、<sup>4)</sup>煮熟性、食味の低下や豆腐、あんのような加工品の歩留まり減少など品質劣化が著しいため、流通過程でも古豆（ヒネ豆）の鑑別には格別の関心が払われているが、現在のところ適確且簡便な鑑定法は見出されていない。

この研究は商品としての豆類の実際的な新古鑑別の手がかりを得るため、脱水素酵素群、Peroxidase, cytochromeoxidase など生体内でエネルギー代謝系、呼吸作用などに直接関与する oxidoreductase 系諸酵素の活性に対する豆類の貯蔵期間の影響を *intra- and extra-tissue* における組織化学的な方法で検定したものである。

なお一部の試料には合成能指標として phosphorylase (starch phosphorylase) の検定も実施した。

この種の鑑別法については麻生ら<sup>1)</sup>(1924)が米の新古鑑別に peroxidase の活性が利用できるとし、林産種子類、アズキなどにも同様な試みがなされたが<sup>9)13)</sup>何れの場合でも古くなり、発芽性が減少するにつれ、peroxidase 活性が減少する傾向は認められるが、新古判定法としては確実性に乏しいことも明かにされている。

また TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium

chloride) を用いる色素還元能テストで農産種子の発芽力を推定する試みが古くから行なわれており、BAIRD<sup>2)</sup>ら(1950)及びMCMASTERS<sup>5)</sup>ら(1954)がトウモロコシの乾燥条件や凍結処理が発芽力に及ぼす影響を TTC test で検定した事例なども知られている。併し本研究のように成熟休眠種実について多種類の oxidoreductase 系の酵素活性を種実の貯蔵期間との関連で比較観察した例は知られていない。

## 材 料 と 方 法

### 1. 供試料

供試豆類は信頼できる専門店から毎年11月~12月（エンドウは9月）にその年度に生産されたものを購入し、室温でデンケーター内に保存した次の5種30銘柄の試料を用いた。

- (1) ダイズ(*Glycine hispida* MAXIMOWICZ) 9 銘柄
- (2) アズキ(*Phaseolus angularis* WIGHT) 7 銘柄
- (3) インゲンマメ (*Phaseolus vulgaris* L.) 10 銘柄
- (4) ササゲ (*Vigna sinensis* SAVI) 2 銘柄
- (5) エンドウ (*Pisum Sativum* L.) 2 銘柄

### 2. 試料の前処理

供試材料はそのままでは薄切も磨砕も困難なので冷蔵庫内（2℃）で脱脂綿に蒸留水を含ませたシャ

ーレ上で吸水膨潤させた。低温で処理したのは発芽作用による酵素活性の変化をおさえ、休眠状態を維持するためである。

### 9. 13) 3 発芽試験

30～50メッシュの滅菌海砂に種子消毒剤(オーソサイド、三共KK)で消毒した試料各100粒を埋め、滅菌ガーゼで覆い25°Cの定温器内でときどき給水して発芽させ、3日後に発芽勢、7日後に発芽率を算定した。

## 4. 酵素活性の検定法

### (1) 組織切片による検定

切片は無固定氷結切片(20～25μ)及びハンドセクション(子葉は2～3mm厚、幼芽幼根は縦に2分割)とし、酵素別呈色反応は次の処理によった。

#### a. Peroxidase

麻生<sup>1)</sup>(1924)が米の新古鑑別に用いた guaiacol などの polyphenol 類を用いる方法はいささか古典的ではあるが応用例も多いので敢えて採用した。

|       |                               |      |                                  |
|-------|-------------------------------|------|----------------------------------|
| 1 %   | guaiacol                      | 10ml | } 使用直前に混合<br>15～20分反応<br>グリセリン封入 |
| 0.3 % | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 7ml  |                                  |

#### b. Cytochrome oxidase

α-naphthol と N-dimethylparaphen-diamine を用いる NACHLAS<sup>7)</sup>(1958)の変法<sup>11)</sup>によった。

#### c. Phosphorilase

この酵素は次の様に glycogen やデンプンの合成分解を触媒する酵素であるがこの研究では glucose-1-phosphate を基質とし、acetate buffer (PH 6.0) 25°C、2時間、incubate し、沃素反応で検出する方法によった。この反応では合成されたデンプンは赤紫色を呈し、既存の

デンプン粒とは識別できるので種実内各部にデンプン粒が分布する豆類の場合にも適用できる。

### d. 脱水素酵素群

#### (a) Succinic dehydrogenase (SDH)

ここでは主として動物組織に応用される NACHLAS<sup>7)</sup>(1958)の方法を用いた。

#### (b) NAD-dehydrogenases 及び NADP-dehydrogenases

補酵素としての nicotinamido adenine dinucleotide (NAD) 及び nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) を必要とする酵素群であり、ここでは、Alcohol dehydrogenase (ADH)、malate dehydrogenase (MDH) 及び glutamate dehydrogenase (GDH) について NACHLAS、WALKER and SELNGMAN<sup>6)</sup>(1958)の方法を準用し、Nitro-BT と NAD 又は NADP を PH 7.4 の phosphate buffer に加えたものを基準液とし、酵素別の基質を加えたものを反応液とした。なお試料の一部には数種の基質混合液を添加したものや NAD、NADP を加えない反応液も試みた。

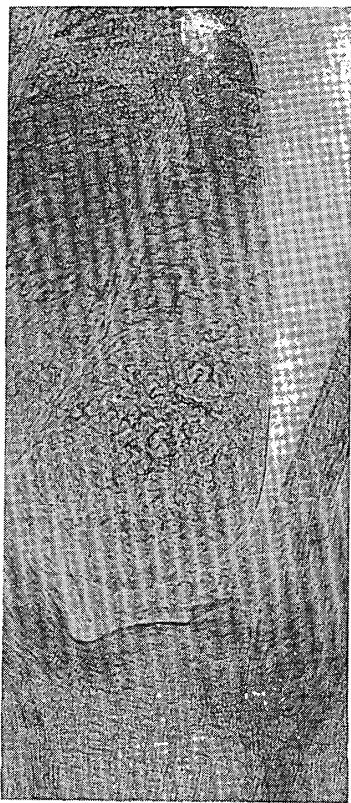
#### (c) TTC test

これは補酵素基質などを添加しない脱水素酵素反応の一種とみることができ、1% TTC 水溶液に切片を1.5～2.0時間暗所で室温を浸漬する。

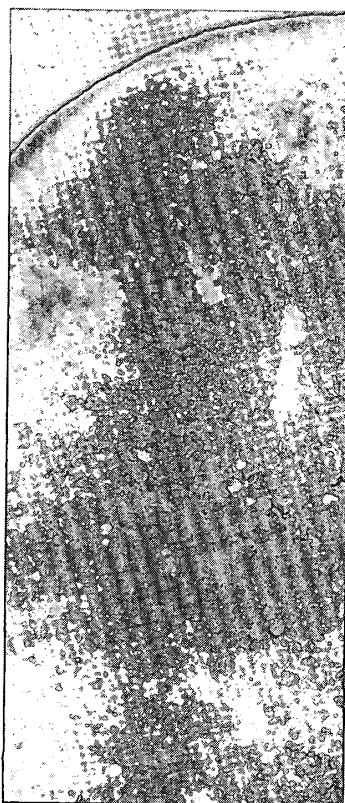
### (2) 組織磨砕液を用いる検定

#### a. 色素

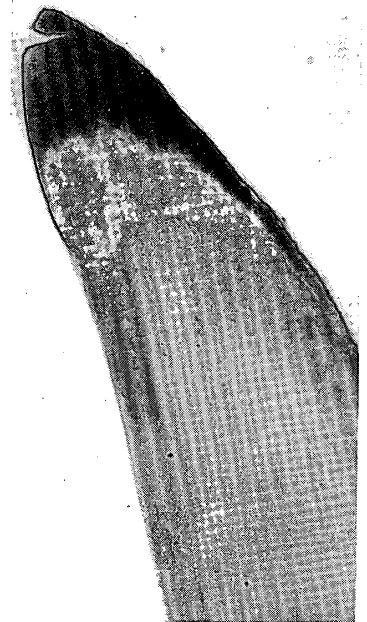
Thunberg 管を用いる方法では水素の最終受容体としての色素には methylen blue が用いられていたが、本研究では観察時間の短縮を図る目的で生乳の細菌汚染の検定に用いられる resazurin を用いた。この色素は methylen blue とちがって完全脱色に至るまでに青紫→赤紫→紅→淡紅→無色と階段的に変色し、現場向に作られた



④基質助酵素無添加Nitro BT  
染色(エンドウ幼芽4.3年0%)



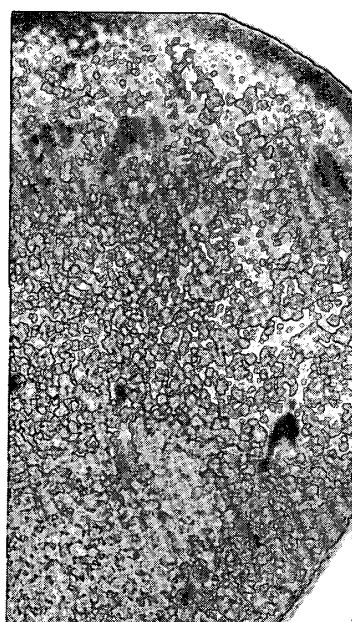
⑤Cytochrome Oxidase  
(インゲンマメ子葉0.3年98%)



⑥Phosphorylase  
(インゲンマメ幼根3.3年1%)



⑦Peroxidase  
(ダイズ子葉1.3年91%)

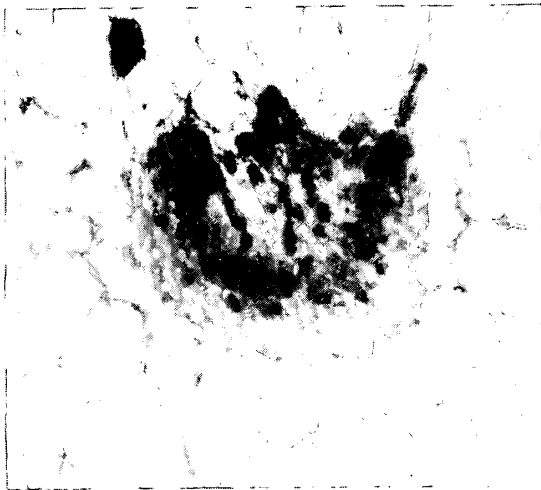


⑧MDH  
(エンドウマメ子葉1.3年  
96%)



⑨ADH  
(アズキ子葉0.3年99%)

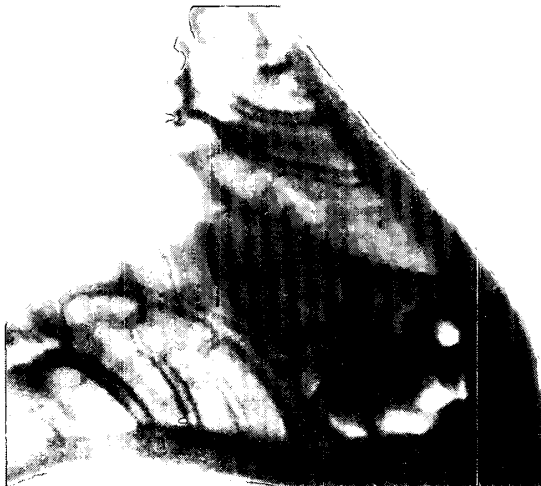
## 第1図 酵素活性の分布



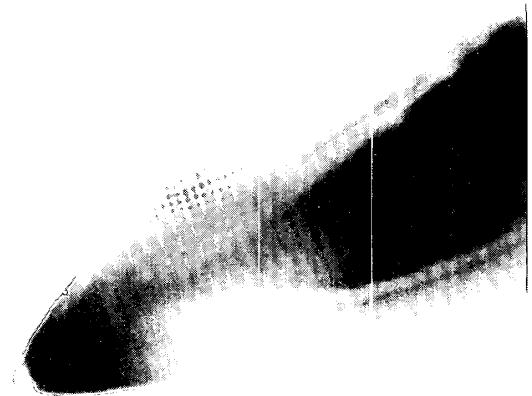
⑧ Peroxidase  
(ダイズ子葉維管束0.3年96%)



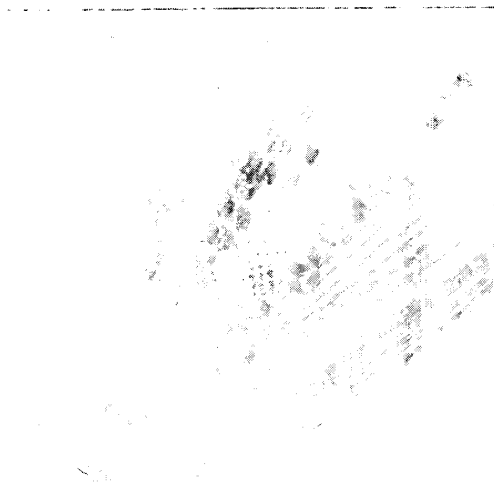
⑨ NADP-2S(ダイズ幼根  
Procambium, 0.3年100%)



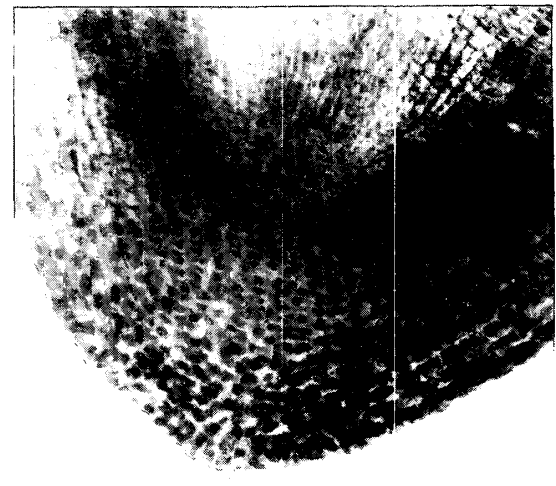
⑩ MHD  
(インゲンマメ幼芽1.3年96%)



⑪ TTC反応  
(ダイズ幼根1.3年91%)



⑫ SDH  
(エンドウ幼根1.3年96%)



⑬ GDH  
(インゲンマメ幼根1.3年94%)

標準色調表（和光純薬）も発売されており、色調判定が鋭敏で判定の個人差もさけ得る利点がある。色素は滅菌蒸溜水で  $3.2\text{mg}/100\text{ml}$  の濃度に調製し冷暗所に保蔵する。

#### b. 組織磨砕液の調製

吸水膨潤させた試料各  $100$  粒前後を子葉と幼芽幼根部とに分割し次の処方の抽出液を  $18\text{mg}$  当たり  $1\text{ml}$  の割合で加え、窒素ガス置換デシケーター内で磨砕した。

抽出液…  $0.2\text{M}$  phosphate buffer (PH7.4)

$$\left. \begin{array}{l} 50\text{ml} \\ \text{sucrose } 13.7\text{g} \end{array} \right\} \text{純水を加え } 100\text{ml}$$

#### c. 反応の実施

反応液は NitroBT を純水でおきかえたほかは切片の場合と同様処方とし Thunberg 管に反応液  $1\text{ml}$ 、組織磨砕液  $1\text{ml}$ 、色素  $0.2\text{ml}$  を用い、常法通り脱気混合し  $28^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  の室温で脱色速度を  $60$  分間観測した。

脱色度は標準色調表により判定し、青から無色まで漸变的に排列された色調表の各階級値 ( $0 \sim 5$ ) に到達するまでの時間をストップウォッチで計測記録し、脱色速度で酵素活性を比較した。

| 色調番号     | 0                  | 1                    | 2                 | 3                  | 4                  | 5                |
|----------|--------------------|----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 色調       | 青紫                 | 紫                    | 赤紫                | 紅                  | 淡紅                 | 白                |
| マンセル色調番号 | $5\text{PB}^{8/2}$ | $7.5\text{PB}^{8/4}$ | $5\text{P}^{8/4}$ | $5\text{RP}^{8/6}$ | $5\text{RP}^{9/2}$ | $\text{N}^{9/0}$ |

|       |                              |   |
|-------|------------------------------|---|
| 子葉    | エンドウ                         |   |
|       | ダイズ                          |   |
|       | アズキ<br>インゲンマメ<br>ササゲ         |   |
| 幼芽・幼根 | 幼芽<br>ダイズ                    |   |
|       | 幼根<br>アズキ・インゲンマメ<br>ササゲ・エンドウ |   |
|       |                              | —                      ±                      +                      #                      ≡ |

第2図 組織切片の組織化学的反応強度の評価基準

(評点換算 —… 0, +… 2, ≡… 4)  
±… 1, #… 3

第1表 組織切片によるOxidoreductase系酵素群及びPhosphorylase 活性の比較

| 試料番号 |       | 酵素の種類<br>種実の部位<br>品 種 | 脱 水 素 酵 素   |               |               |            |              |               |             |               |               |              |               |               | TTC test |     |     |  |
|------|-------|-----------------------|-------------|---------------|---------------|------------|--------------|---------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|---------------|----------|-----|-----|--|
|      |       |                       | A D H       |               |               |            | M D H        |               |             |               | G D H         |              |               |               |          |     |     |  |
|      |       |                       | 子 葉         | 幼 芽           | 幼 根           | 子 葉        | 幼 芽          | 幼 根           | 子 葉         | 幼 芽           | 幼 根           | 子 葉          | 幼 芽           | 幼 根           | 子 葉      | 幼 芽 | 幼 根 |  |
| ダ    | GH-1  | 黄 色 種                 | ++<br>3.0   | ++~+<br>2.5   | ++~+<br>2.5   | +++<br>4.0 | +++<br>4.0   | +++<br>4.0    | ++<br>2.0   | ++~+<br>4.0   | ++<br>2.0     | -<br>0       | ++~+<br>0.9   | +++~+<br>3.7  |          |     |     |  |
|      | GH-2  | 黒 豆                   | ++~±<br>1.5 | ++~+<br>2.7   | ++~+<br>2.3   | ++<br>3.0  | +++<br>4.0   | +++<br>4.0    | ++<br>2.0   | ++~±<br>1.4   | ++~+<br>2.2   | -<br>0       | ++~+<br>1.5   | +++<br>4.0    |          |     |     |  |
|      | GH-3  | 黄 色 種                 |             | ++<br>3.0     | ++<br>2.0     |            | +++<br>4.0   | ±<br>1.0      |             | ++<br>2.0     | +++~2<br>3.8  |              | ±<br>1.0      | +++<br>4.0    |          |     |     |  |
| イ    | GH-4  | 黒 豆                   |             | ±<br>1.0      | ++<br>2.0     |            | ++<br>2.0    | +++<br>3.0    |             | +++<br>4.0    | +++~++<br>3.7 |              | ±<br>1.0      | +++<br>4.0    |          |     |     |  |
|      | GH-5  | 黄 色 種                 |             | ++~+<br>1.6   | -<br>0        |            | ++<br>2.0    | ±<br>1.0      |             | ++~+<br>1.6   | ++~+<br>1.7   |              | -<br>0        | -<br>0        |          |     |     |  |
|      | GH-6  | "                     |             | +++<br>4.0    | ++<br>2.0     |            | +++<br>4.0   | ++<br>2.0     |             | ++<br>2.0     | +++<br>3.0    |              | -<br>0        | ±~+<br>0.3    |          |     |     |  |
| ズ    | GH-7  | 黒 豆                   |             | ++<br>2.0     | +++<br>3.0    |            | +++<br>3.0   | ++<br>2.0     |             | +++<br>4.0    | +++<br>4.0    |              | -<br>0        | ++~+<br>1.6   |          |     |     |  |
|      | PA-1  | 大 納 言                 | ++<br>2.0   | +++~+<br>2.8  | +++~+<br>2.6  | +++<br>4.0 | ++~±<br>1.3  | +++<br>3.0    | ++<br>2.0   | +++~±<br>2.0  | ++<br>2.5     | -<br>0       | -<br>0        | +++~++<br>3.9 |          |     |     |  |
|      | PA-2  | 普 通 種                 | ++<br>2.0   | +++~+<br>2.2  | +++~+<br>2.0  | +++<br>4.0 | ++<br>2.0    | +++<br>4.0    | ++<br>2.0   | +++~+<br>2.3  | +++~+<br>2.9  |              | ±~+<br>0.1    | +++<br>4.0    |          |     |     |  |
| ア    | PA-3  | "                     |             | ±<br>1.0      | ±<br>1.0      |            | ±<br>1.0     | ++<br>2.0     |             | ±~+<br>0.2    | ++<br>2.0     |              | +++~+<br>2.2  | +++<br>3.0    |          |     |     |  |
|      | PA-4  | "                     |             | -<br>0        | ±<br>1.0      |            | -<br>0       | ++<br>2.0     |             | -<br>0        | ++<br>2.0     |              | ++~+<br>0.3   | +++~++<br>3.2 |          |     |     |  |
|      | PA-5  | "                     |             | ++<br>2.0     | ++<br>2.0     |            | ±<br>1.0     | ++<br>2.0     |             | ±~+<br>0.3    | ++<br>2.0     |              | ±~+<br>0.2    | +++~+<br>2.6  |          |     |     |  |
| キ    | PA-6  | 大 納 言                 |             | ±<br>1.0      | ++<br>2.0     |            | ++<br>2.0    | +++<br>3.0    |             | -<br>0        | ++<br>2.0     |              | -<br>0        | +++~+<br>2.8  |          |     |     |  |
|      | PA-7  | 普 通 種                 | +++<br>4.0  | ++~+<br>1.3   | +++<br>3.0    | +++<br>3.0 | ++<br>2.0    | +++<br>3.0    | +++<br>3.0  | +++~+<br>2.5  | +++~++<br>3.5 | -<br>0       | -<br>0        | ±~+<br>0.8    |          |     |     |  |
|      | PV-1  | 普 通 種                 | ++<br>2.0   | +++~+<br>2.3  | +++~+<br>2.5  | +++<br>4.0 | ++<br>2.0    | +++~++<br>3.4 | ++<br>2.0   | ++<br>2.0     | +++<br>2.0    | +++~+<br>1.3 | ++~+<br>0.9   | +++~++<br>3.6 |          |     |     |  |
| イ    | PV-2  | 大正金時                  | ++<br>2.0   | +++~±<br>2.0  | ++<br>2.0     | +++<br>4.0 | ++<br>2.0    | +++~++<br>3.4 | ++<br>2.0   | +++~±<br>1.5  | +++<br>2.0    | +++~+<br>0.8 | +++~±<br>1.6  | +++~+<br>2.4  |          |     |     |  |
|      | PV-3  | うずら豆                  |             |               |               | +++<br>4.0 | +++<br>4.0   | +++<br>4.0    |             |               |               |              |               |               |          |     |     |  |
|      | PV-4  | "                     |             | ±~+<br>0.5    | -<br>0        |            | -<br>0       | ±<br>1.0      |             | +++<br>3.0    | +++~++<br>3.5 |              | ++~±<br>1.4   | +++<br>3.0    |          |     |     |  |
| ゲ    | PV-5  | 普 通 種                 | ++<br>2.0   | ++<br>2.0     |               |            | ±<br>1.0     | ++<br>2.0     |             | +++~+<br>2.2  | +++<br>4.0    |              | +++~±<br>2.3  | +++<br>4.0    |          |     |     |  |
|      | PV-6  | 大正金時                  |             | ++~±<br>1.3   | ±<br>1.0      |            | ±<br>1.0     | ±<br>1.0      |             | +++~++<br>3.6 | +++<br>4.0    |              | -<br>0        | ++~±<br>1.2   |          |     |     |  |
|      | PV-7  | うずら豆                  | ++<br>2.0   | ++~+<br>1.2   | +++~+<br>3.3  | +++<br>4.0 | ++<br>2.0    | +++<br>4.0    | ++<br>2.0   | ++~+<br>0.3   | +++~±<br>1.7  | -<br>0       | -<br>0        | -<br>0        |          |     |     |  |
| マ    | PV-8  | 普 通 種                 | +++<br>3.0  | +++~+<br>3.7  | +++~+<br>3.7  | +++<br>4.0 | +++~+<br>2.2 | +++<br>4.0    | ++<br>2.0   | ++~+<br>1.0   | +++<br>3.0    | +++~+<br>0.3 | -<br>0        | -<br>0        |          |     |     |  |
|      | PV-9  | "                     |             | ++~±<br>1.4   | +++<br>4.0    |            | ±<br>1.0     | +++<br>4.0    |             | +++<br>4.0    | +++<br>4.0    |              | ±~+<br>0.2    | ±~+<br>0.2    |          |     |     |  |
|      | PV-10 | "                     |             | +++<br>3.0    | +++<br>4.0    |            | ++<br>4.0    | +++<br>4.0    |             | ++~±<br>1.8   | +++~±<br>1.6  |              | -<br>0        | -<br>0        |          |     |     |  |
| ササゲ  | VS-1  | 普 通 種                 | ++<br>2.0   | +++~+<br>2.2  | +++~+<br>2.3  | +++<br>3.0 | ±<br>1.0     | +++<br>3.0    | ++~±<br>1.7 | +++~+<br>2.2  | +++~+<br>2.2  | -<br>0       | +++~+<br>1.6  | +++~++<br>3.6 |          |     |     |  |
|      | VS-2  | "                     |             | ±~+<br>0.3    | +++<br>3.0    |            | ±<br>1.0     | +++<br>3.0    |             | ±~+<br>0.3    | +++~+<br>2.5  |              | -<br>0        | ±~+<br>0.4    |          |     |     |  |
| エンドウ | PS-1  | 青えんどう                 | +++<br>3.0  | +++~++<br>3.7 | +++~+<br>2.9  | +++<br>4.0 | +++<br>4.0   | +++<br>4.0    | ++~±<br>1.5 | +++~++<br>3.3 | +++~+<br>2.3  | -<br>0       | +++~++<br>3.3 | +++~++<br>3.3 |          |     |     |  |
|      | PS-2  | "                     | +++<br>3.0  | +++~+<br>2.6  | +++~++<br>3.6 | +++<br>4.0 | +++<br>4.0   | +++<br>4.0    | +++<br>3.0  | +++~+<br>2.2  | +++~++<br>3.6 | ++~+<br>0.9  | ++~+<br>1.5   | +++~++<br>3.5 |          |     |     |  |

※ + ~ + ..... 反応強度の範囲 2.5 ..... 平均反応強度 (第1図参照)

| Cytochrome<br>Oxidase    | Peroxidase  |   |  | Phosphorylase  |  |   | 貯<br>藏<br>期<br>間<br>(年) | 発<br>芽<br>率<br>(%) | 試<br>料<br>番<br>号 |
|--------------------------|---|---|--|--|--|---|-------------------------|--------------------|------------------|
| 子 葉 幼 芽 幼 根              | 子 葉 幼 芽 幼 根   | 子 葉 幼 芽 幼 根   | 子 葉 幼 芽 幼 根  | 子 葉 幼 芽 幼 根  | 子 葉 幼 芽 幼 根  | 子 葉 幼 芽 幼 根   |                         |                    |                  |
| ++~+<br>2.7<br>++<br>3.0 | ++~+<br>4.0<br>++~+<br>3.4<br>++~+<br>2.0<br>±<br>1.0<br>±~<br>0.8<br>±<br>1.0<br>±<br>1.0<br>++<br>3.0 | +++~++<br>3.5<br>+++~+<br>3.6<br>+++~+<br>2.2<br>+++~+<br>2.4<br>+++<br>4.0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>+~±<br>1.5<br>+~±<br>1.8 | ++~+<br>3.3<br>++~+<br>2.4<br>+++~+<br>3.2<br>+++<br>4.0<br>±<br>1.0<br>+~±<br>1.5<br>+~±<br>1.8 | -<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>+~±<br>1.8<br>+~±<br>1.1 | -<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>-<br>0<br>+~±<br>1.8<br>+~±<br>0.3 | -<br>0<br>+<br>1.0<br>+<br>0.9<br>+<br>1.0<br>+<br>1.5<br>+<br>1.0<br>+<br>1.0<br>+<br>1.0<br>+<br>1.0<br>+~±<br>6.0<br>+~±<br>0.3<br>-<br>-<br>+~±<br>2.4<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br>0.9<br>+<br> |                         |                    |                  |

## 結 果 と 論 議

### 1. 酵素の組織内分布

低温で吸水膨潤させた成熟休眠種実を子葉と幼芽幼根部とに分割し、氷結切片及びハンドセクションを作成したものについてそれぞれの酵素反応を実施し、各酵素の組織内分布を観察した。

酵素活性の組織内分布には本研究の対象とした諸酵素では、酵素の種別によるちがいは殆んど認められず、要約すると次の如くであった。

#### (1) 子葉部

種皮を除いた子葉では、維管束が最も強く、次いで表皮、表皮に隣接した柵状組織、子葉中心部貯蔵組織に反応が現れる。(1-b, d, e, f g 図)

デンプン性貯蔵組織柔細胞では蛋白反応陽性部に酵素活性が認められる。

TTC test, peroxidase, phosphorylase, SHD SHDは概して子葉部での活性が弱く、特に phosphorylase は試料の新古にかかわらず、ほとんど活性が認められなかった。

#### (2) 幼芽・胚軸部

*Glycine* 属のダイズと *Phaseolus* 属のアズキ、インゲンマメなどでは幼芽の組織像に多少の差異はみられるが酵素活性は apical meristem of shoot (頂端分裂組織)と procambium (前形成層), protoderm (原表皮)に最も強く、次いで ground meristem (基本分裂組織), leaf primordium (初生葉組織)などの順にその活性が認められる。(第1図, a, i)

#### (3) 幼根部

幼根部では根端生長点即ち apical meristem of root 及び procambium に最も強くみられ、<sup>10)</sup>(佐藤, 1953 はウズラマメの芽ばえのSDH分布について同様な所見を述べている)次いで

ground meristem の順に酵素活性が分布していた。

(第1図 c, h, j, k, l)

根冠部組織はその最外層は概して強陽性であり、内層部は生長点より酵素活性が弱い場合が多いようであった。(第1図 l)

第1-h 図はこれらの酵素活性が細胞質顆粒に分布するため、呈色反応では核が陰像をなしていることが観察できる。

### 2. 組織切片による Oxidoreductase 系酵素及び Phosphorylase 活性の比較

組織化学的な酵素反応を新、古、29 銘柄の試料について観察した結果を表示すると第1表の如くであり、その際の反応の格づけは第2図に示した方式によった。(供試個体各15~20)

#### a. 脱水素酵素

ここで観察の対象とした脱水素酵素はADH, MDH 及び GDH の3種であり、三者のうちでは GDH が子葉 幼芽 幼根を通じてその活性が弱い傾向が認められた。ここでは補酵素、基質を反応液に添加した場合の反応をみており、3種の脱水素酵素とも豆が古いもの、発芽率の低いものほど酵素活性が減弱する傾向が認められたが、4年以上を経過し、発芽率ゼロのものでも強い活性を示す個体が少なかった。

#### b TTC - test

TTC test は発芽力の検定にテール酸塩などとともに古くから用いられた方法であり、その呈色機構は脱水素酵素群に対する水素受容体として作用してTTCから赤色で水に不溶なフォルマザンが形成されるものであり、他の tetrazolium 塩を用いる方法と理論的には同様であるが、基質、助酵素などを反応液に加えないので、それらの物質の組織内水準が制限因子となるため、概して反応は上述の3種の脱水素酵素の場合より弱いのは当然である。しかし、試料の鮮度特に発芽力との相関は却って3



種の脱水素酵素群より強いことが認められた。しかし、この方法がたゞちに豆類の新古鑑別の指標となるほどの確実性と鋭敏性はないようであった。

#### c Cytochrome oxidase

この酵素は動植物体内に広く分布し TCA cycle に続く電子伝達系の主要酵素であり、動物組織で古くからナジ反応として知られる組織化学的反応を引き起こす G-nadioxidase と同一酵素であることも知られている。

本研究の試料のような成熟休眠状態の豆類でも子葉、幼芽幼根各部にかなり強い酵素活性がみられ、新古、発芽力などによる酵素活性の差もみとめにくかった。(第1表)

#### d Peroxidase

この酵素は動植物体内、特に植物組織にはほとんど例外なく分布し過酸化物の存在で donor からの水素を過酸化物に移行(酸化)させることを触媒する酵素である。第1表にみられるように子葉より幼芽幼根部に強い活性がみられ、cytochrome oxidase とちがって豆の新古ともかなり強い正の相関がみられた。しかし、この酵素活性だけで鮮度や発芽率の推定は困難である。

#### e Phosphorylase

この酵素の独立性や作用機構に関しては論議の多いところではあるが<sup>3)</sup>本研究ではデンプン合成能(starch phosphorylase)を glucose-1-phosphate を基質として検定したのである。

前項でも触れた様にいっばんにどの試料でも子葉はその反応が微弱が陰性であり、これは太田ら<sup>12)</sup>

がミドリササゲの芽ばえでは子葉での代謝型は総体的に catabolic なことを観測としていることから推しても当然であり、主として幼根生長点附近に強い活性が認められる場合が多い。しかし酵素活性と発芽率貯蔵期間などの相関は全く認められ

ず、新豆より発芽力を失ったヒネ豆により強い活性が観察された例が5種の豆を通じて観察された。

## 2. 組織磨砕液による脱水素酵素群活性の比較

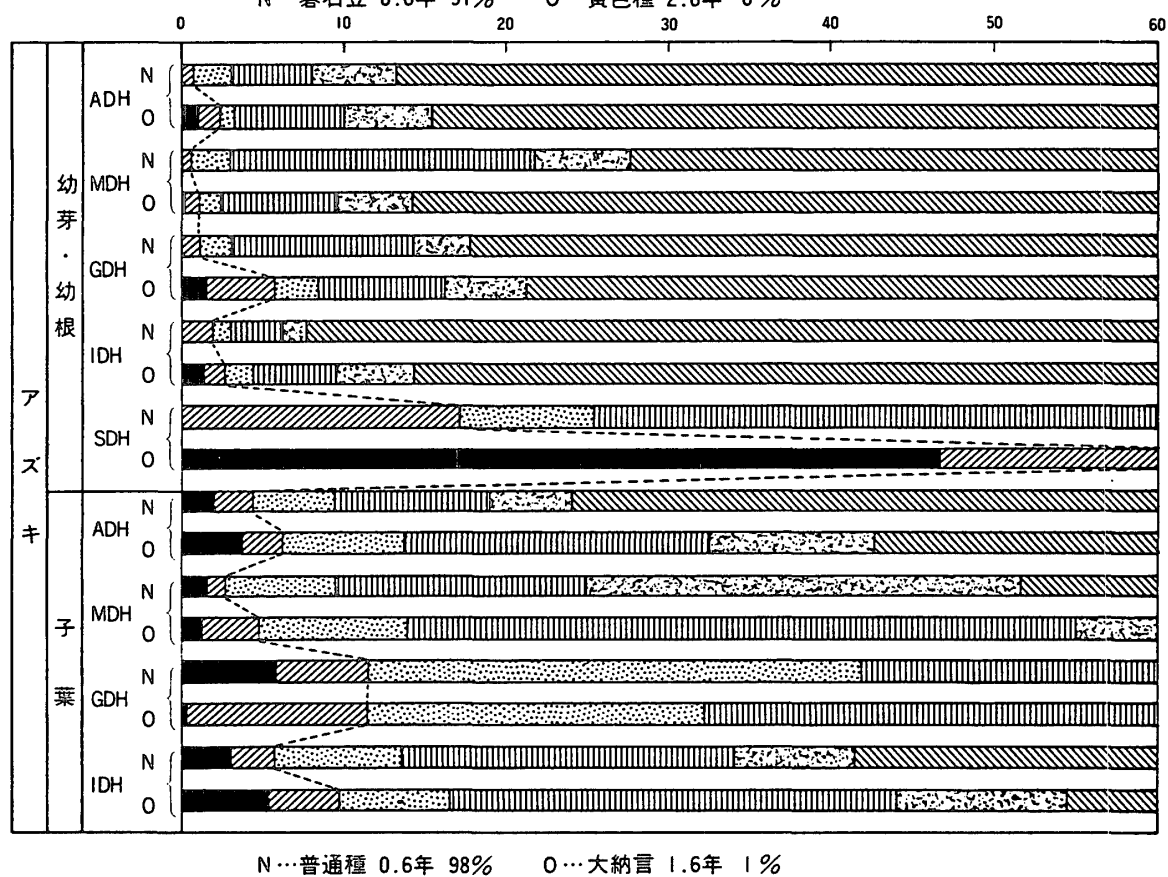
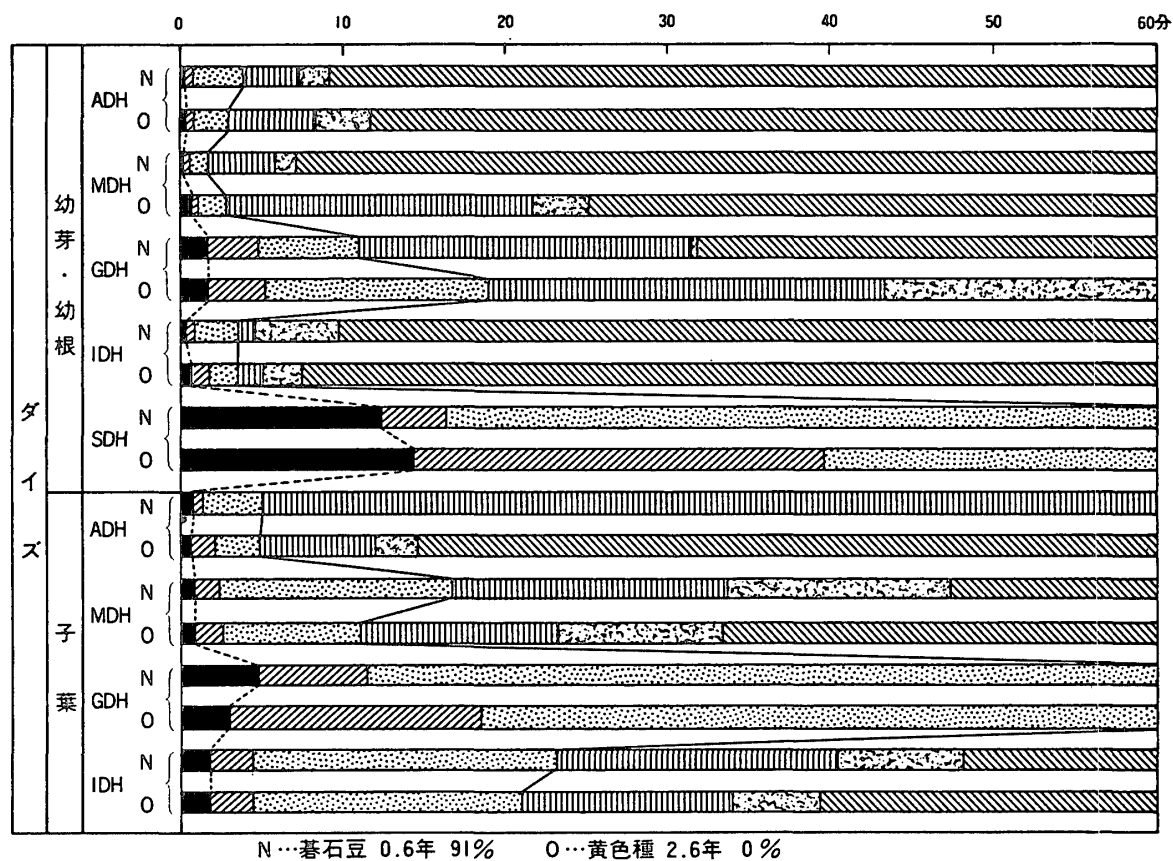
ここでは子葉と幼芽幼根部の磨砕液を用い Thumberg 管法により、resazurin の脱色速度で活性度を比較した。切片の場合と同様に基質、補酵素剤の添加した反応液を用いた場合のほか、基質または補酵素の一方または両方を除いた反応液、さらには基質混合液を用いた場合について種実の新古及び発芽率と酵素活性度との関係を比較した。対象とした酵素は組織切片の場合の NAD-ADH, NAD-MDH, NAD-GDH のほかに NADP-isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) と (SDH) とを加えた。

(1) 基質及補酵素を添加した場合の反応(第3図)

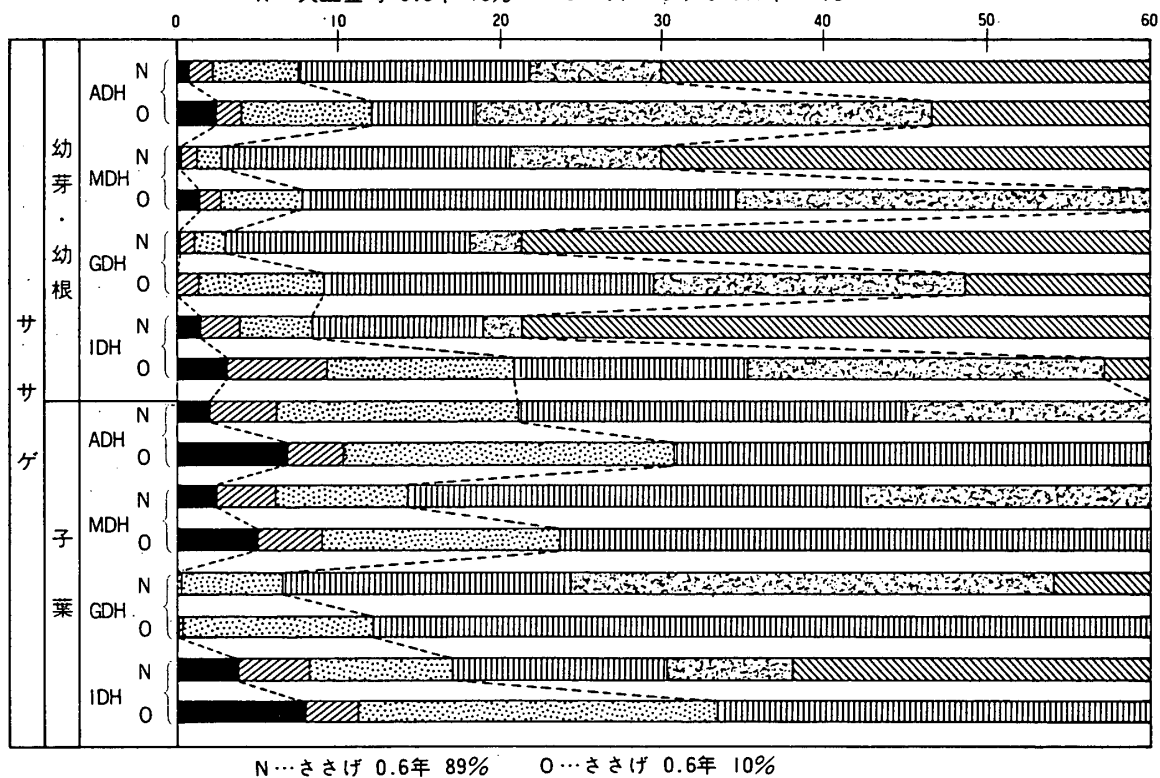
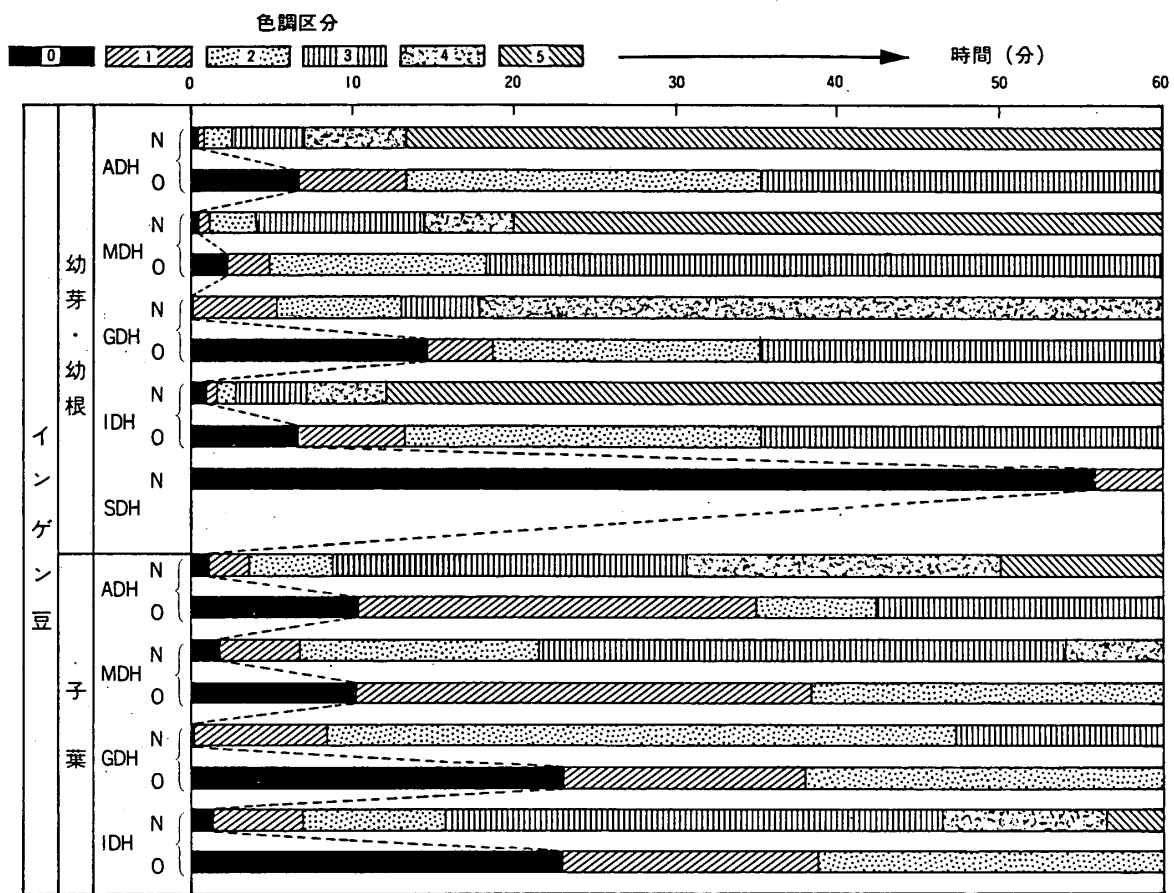
#### a 脱水素酵素群の種類別活性

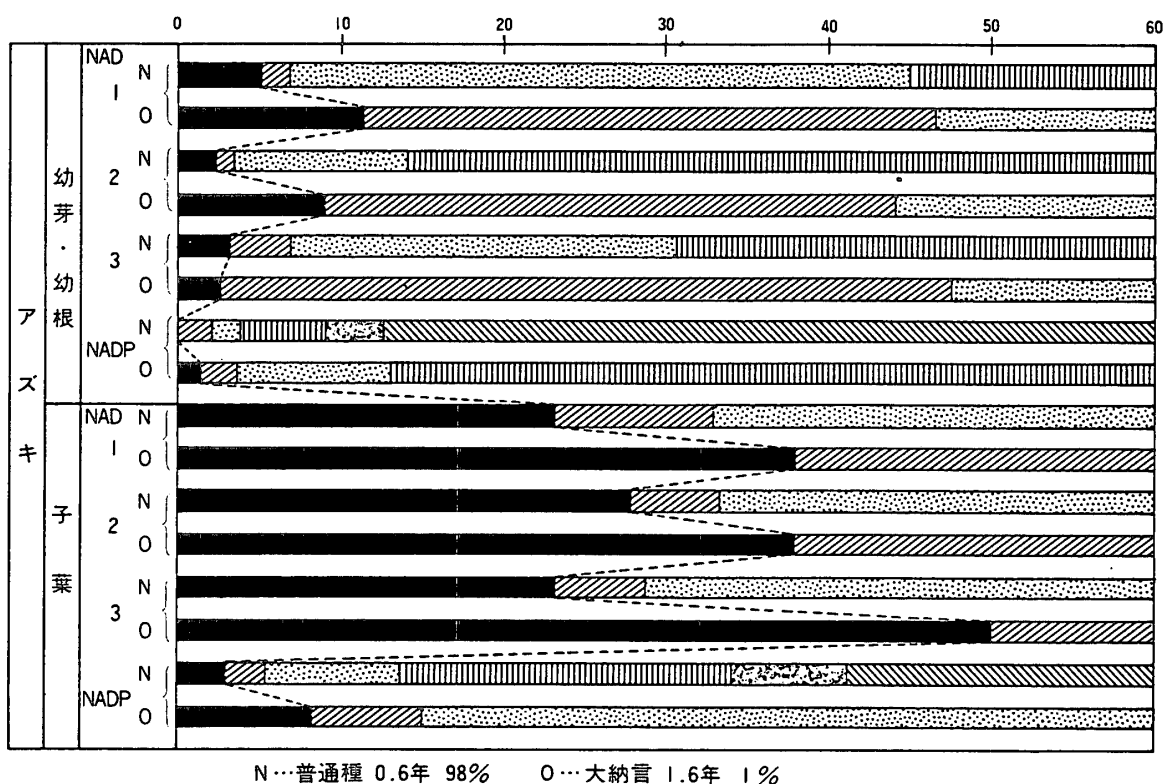
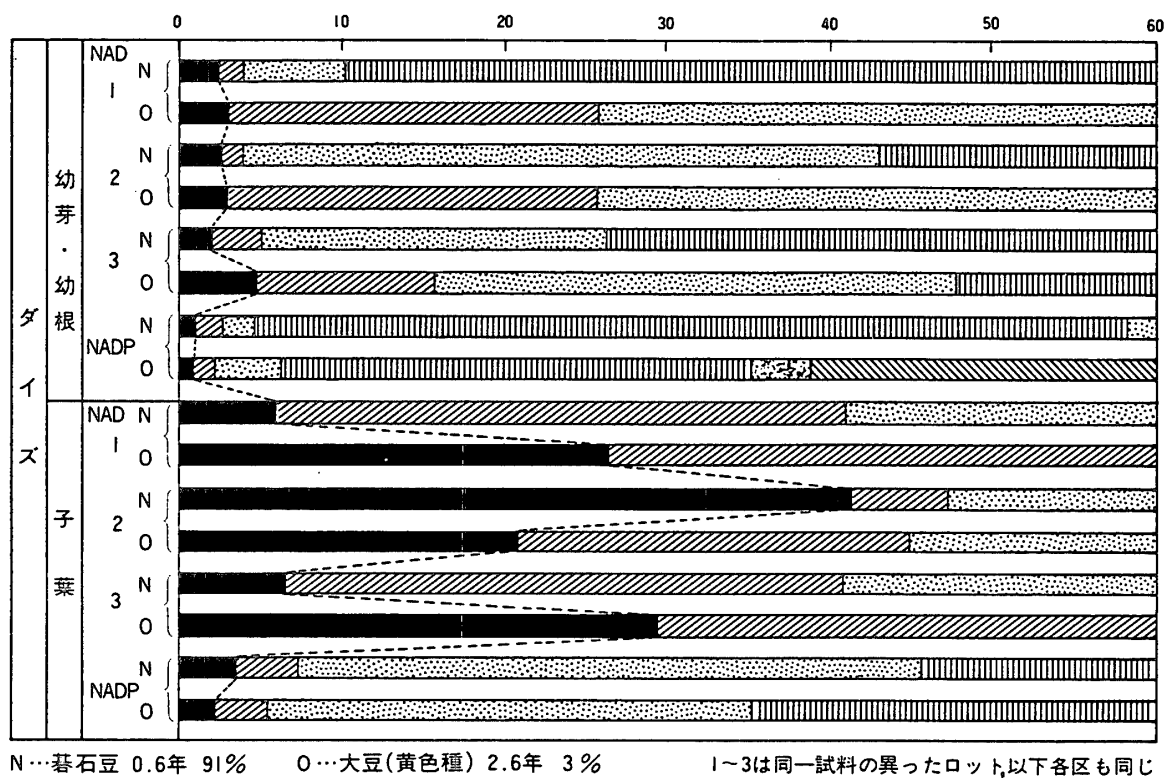
この処方での反応速度は組織磨砕液中の酵素活性(hydrogenase だけでなく diaphorase をも含めて)だけが制限因子で前項の切片による脱水素酵素群の反応に対応するものであり、酵素の種類別活性度をも示すものである。

全般的に SDH が最も活性が低く、NAD, NADP 依存性酵素では IDH, ADH, MDH がほぼ同水準で GDH はかなり活性が低かった。順位をつけるとすれば IDH, ADH > MDH > GDH > SDH となるようである。たゞしササゲでは概して MDH の活性が最も強い傾向を示した。

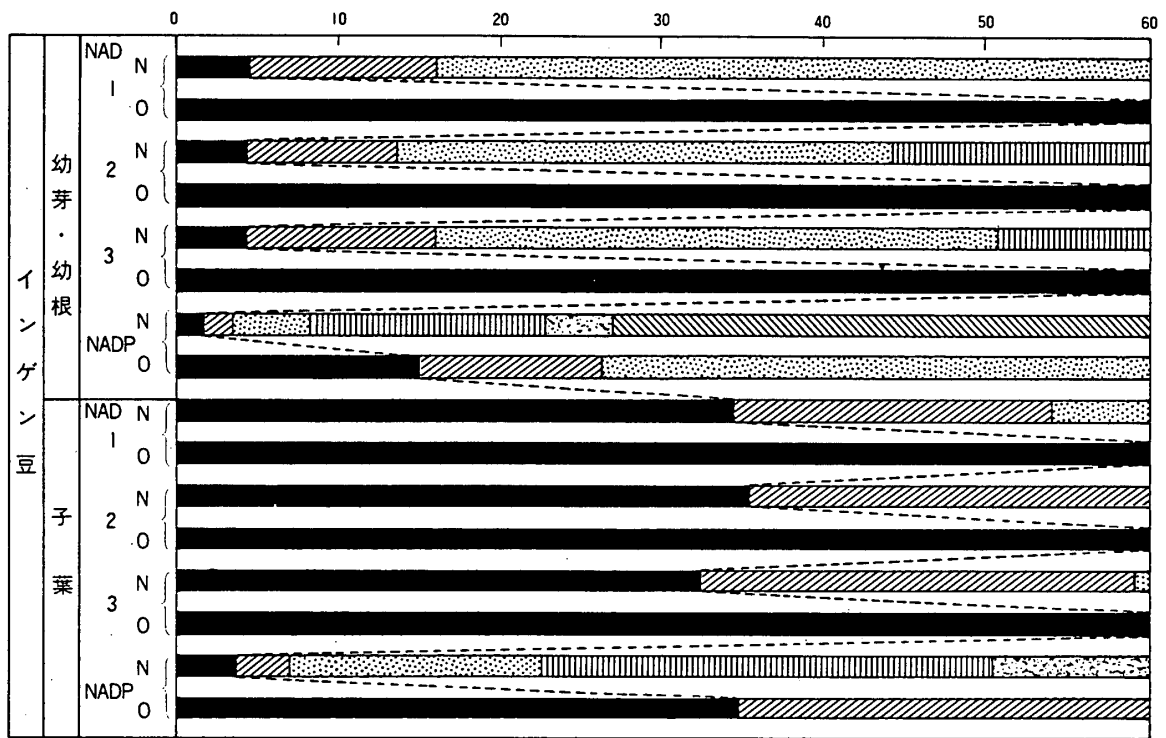


第3図 基質と補酵素を添加した組織磨砕液のResazurin脱色反応

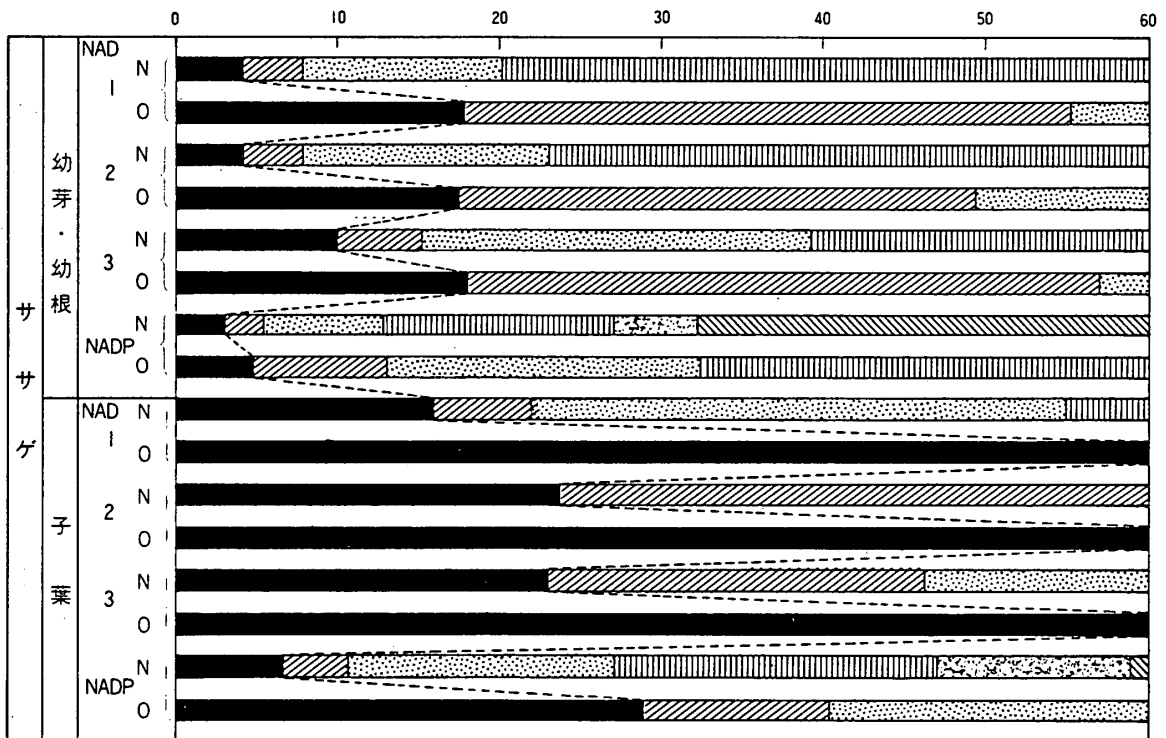




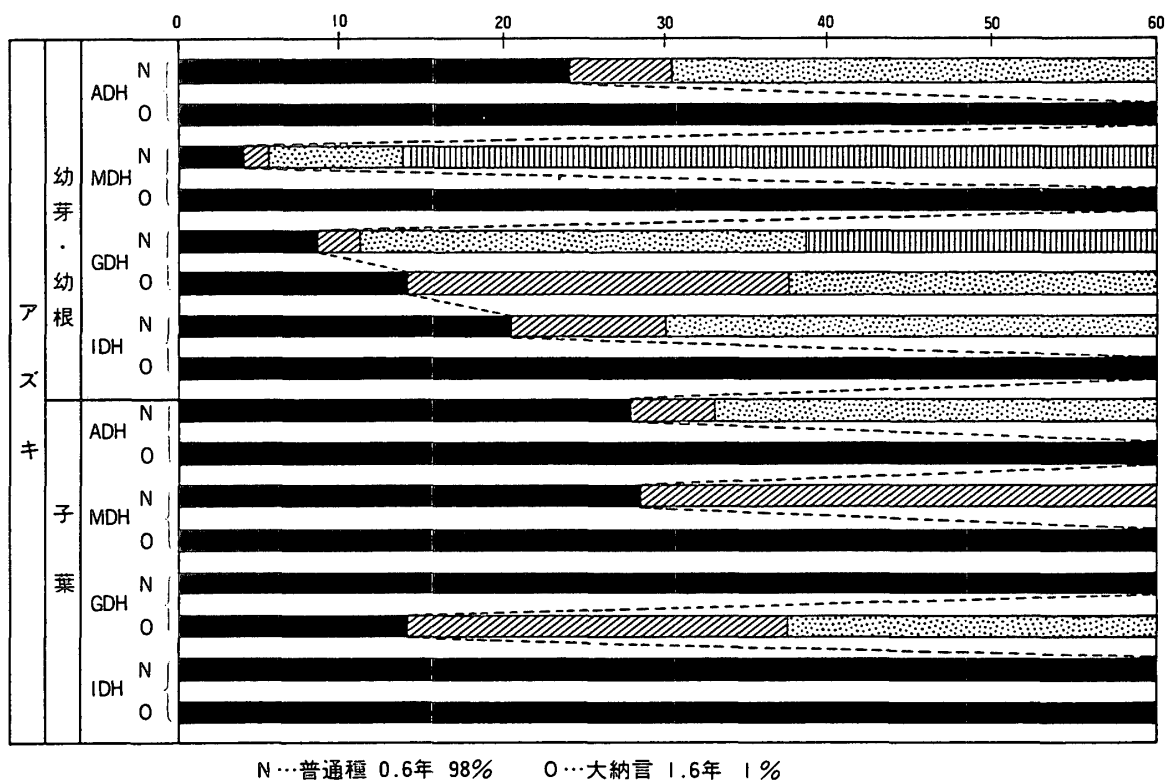
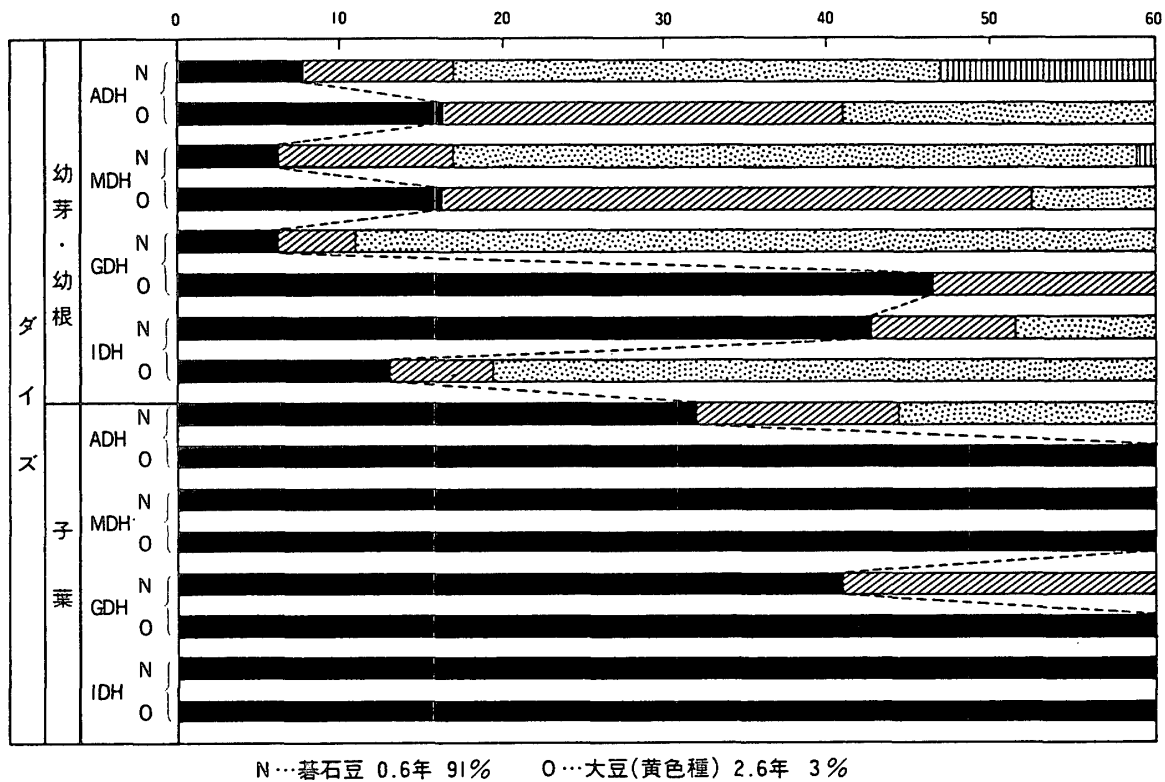
第4図 補酵素だけ添加した組織磨砕液のResazurin脱色反応



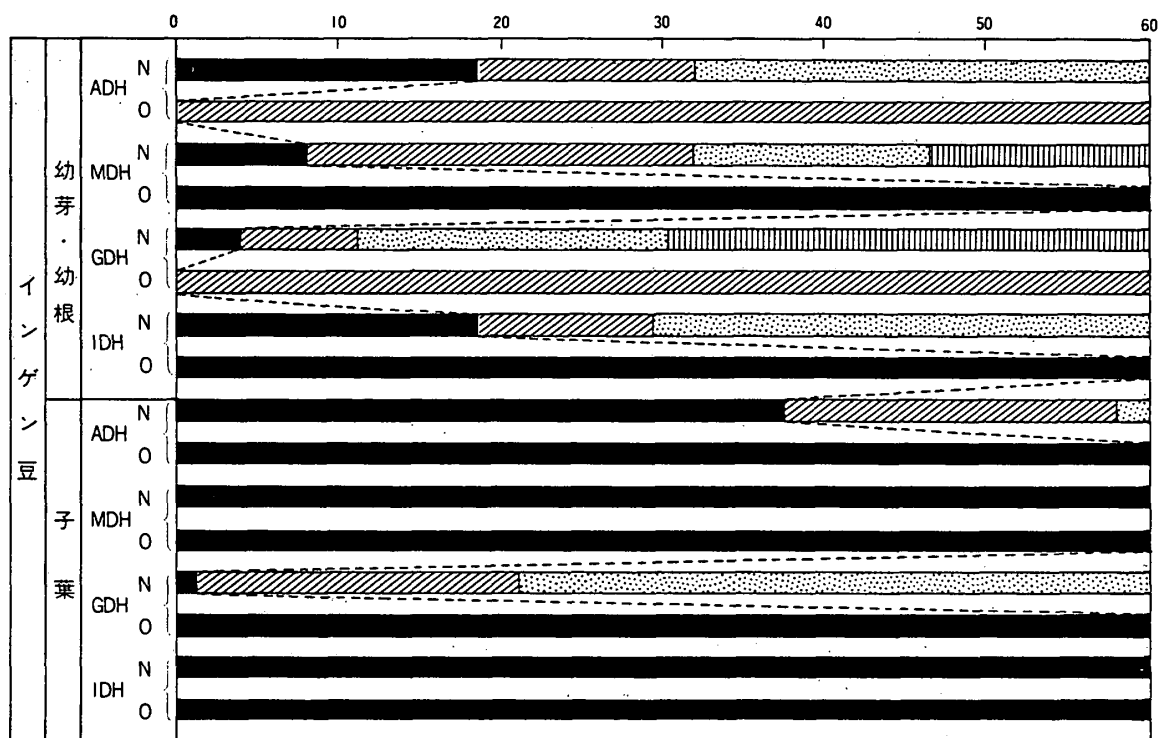
N…大正金時 0.6年 70%    O…白いんげん 5.6年 0%



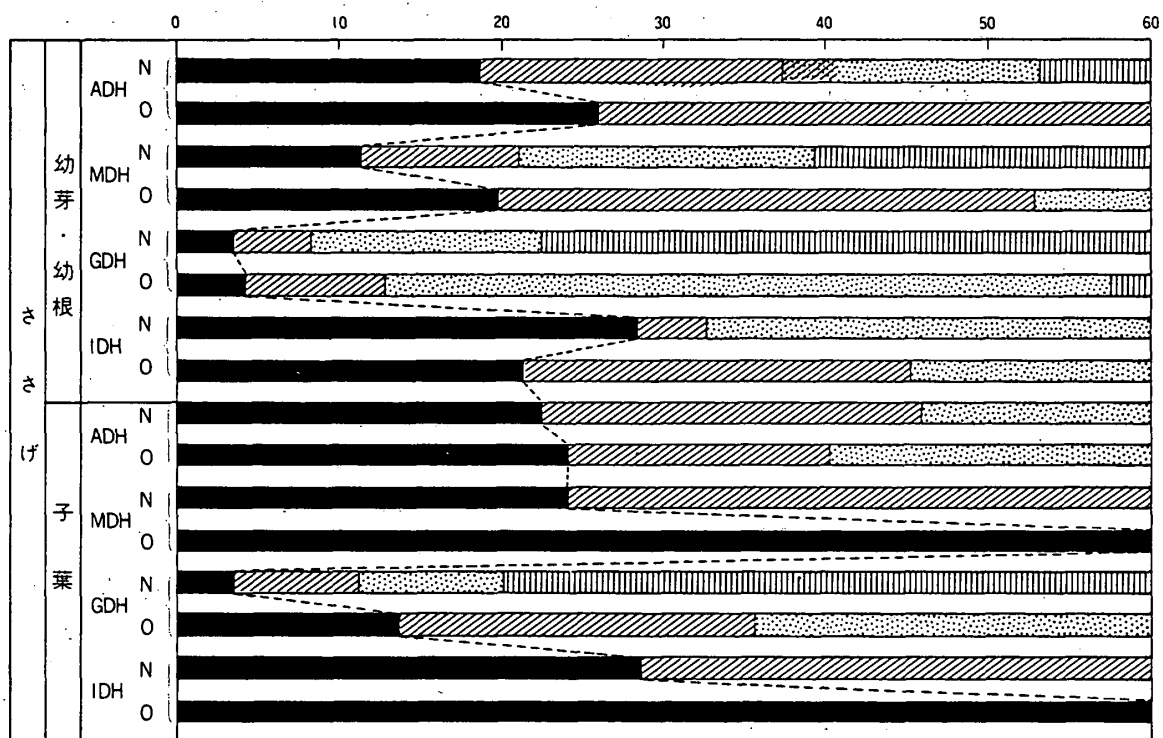
N…ささげ 0.6年 89%    O…ささげ 0.6年 10%



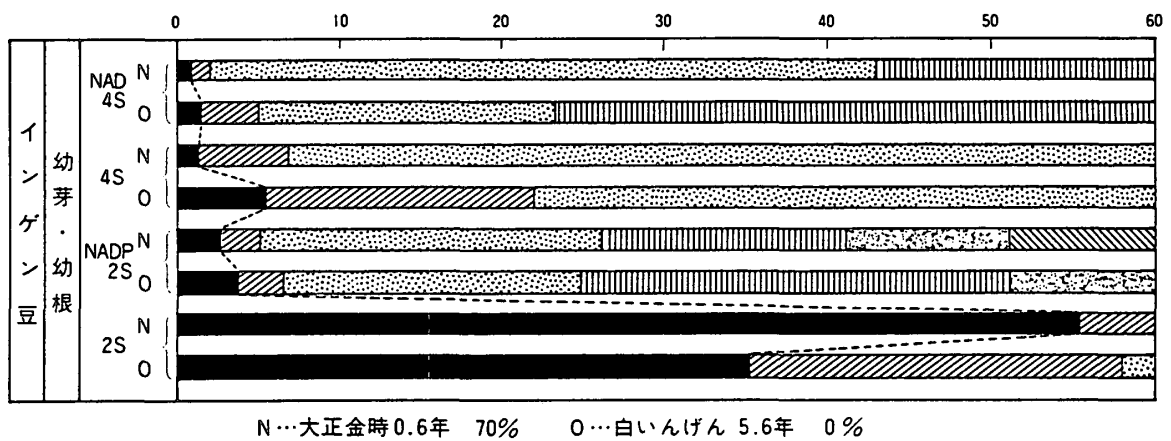
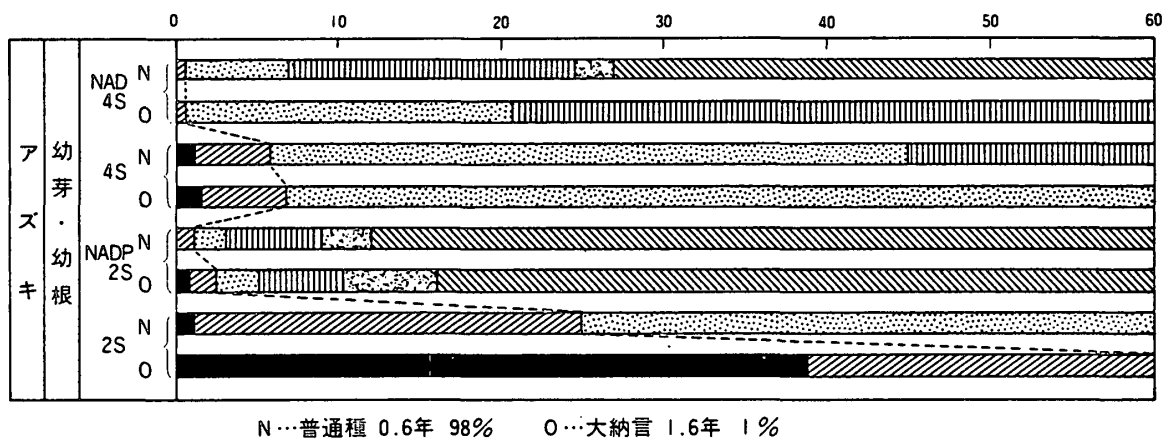
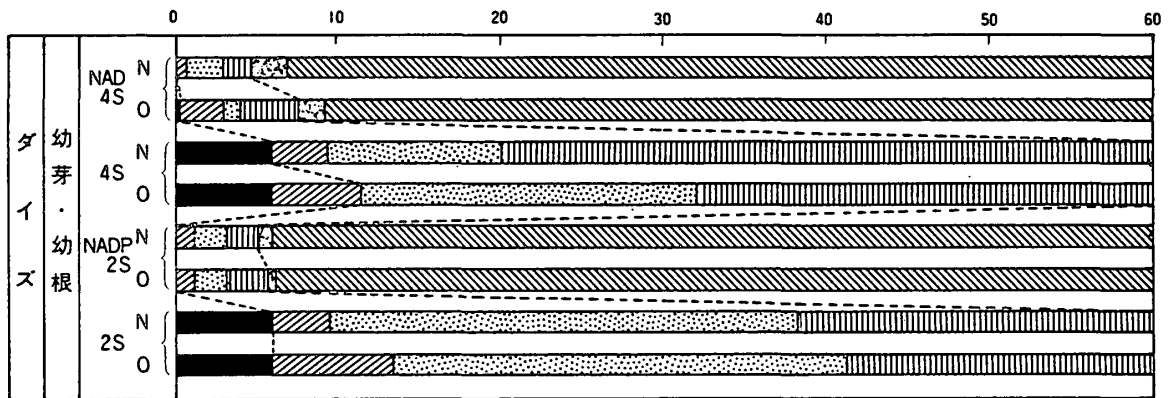
第 5 図 基質だけ添加した組織磨碎液のResazurin脱色反応



N…大正金時 0.6年 70%    O…白いんげん 5.6年 0%

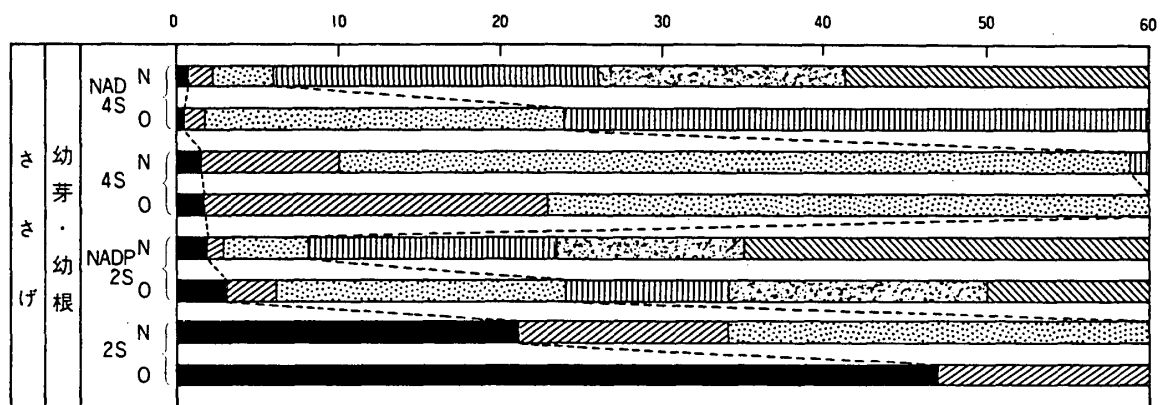


N…ささげ 0.6年 89%    O…ささげ 0.6年 10%

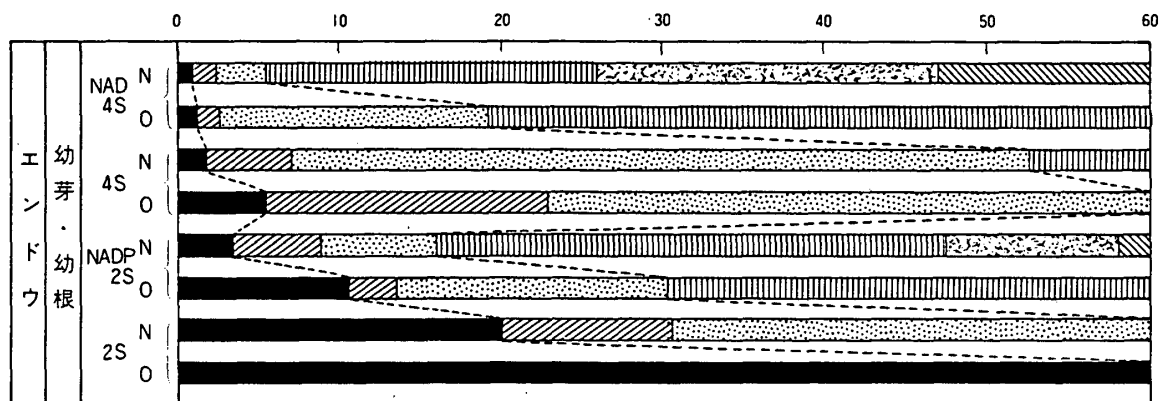


第6図 基質混合液と補酵素添加(NAD-2S)及び  
基質混合液のみ添加(4S, 2S)組織磨砕液のResazurin脱色反応





N…ささげ 0.6年 89%    O…ささげ 0.6年 10%



N…アエンドウ 0.6年 65%    O…アエンドウ 5.6年 0%

## b 試料の貯蔵期間と酵素活性

貯蔵期間と発芽率に明確なちがいのある5種の豆のそれぞれ2試料間の酵素活性を比較すると第3図のように概して古く発芽率の低い試料が各酵素ともその活性が低い傾向が認められた。しかしその差は概して僅少であり、ダイズ子葉の全部の酵素活性と幼芽幼根のIDH、アズキ子葉のIDHは古い試料の方が強い活性を示しており、休眠種実の脱水素酵素活性を新古鑑別の指標とすることは本法のような半定量的な手法でも困難であると考えられる。

### (2) 補酵素のみ添加した場合の反応(第4図)

この場合は組織に含まれる基質の水準が制限因子と考えられ、概して古いものは反応速度が低く、したがって基質含量も低いことを示唆しているがインゲン、ダイズの子葉では新旧逆転しているものも見出された。

### (3) 基質のみを添加した場合の反応(第5図)

試料組織中の補酵素の水準が制限因子となる場合であり反応は概して前2項の場合より弱く、古いものが低い傾向は前二者よりかなり明瞭であり、新旧逆転現象もみられなかった。このことは補酵素としてNAD, NADPの休眠種実組織内の水準は低く、貯蔵中に減少するらしいことも推定され、組織内補酵素量測定は新古鑑別の手がかりとしては有力な手段と考えられ、この点に関しては別途研究を計画中である。

### (4) 基質混合液と補酵素剤を添加した場合の反応

(第6図)

ここでは lactate glutamate, malate を切片反応液と同じ濃度で混合し、NADを加えたものをNAD-4S, isocitrate, glucose-6-phosphate とNADPを加えたものをNADP-2S. 補助酵素を除いたものをそれぞれ4S, 2Sと区分して反応を実施した結果は第6図の如くである。

この反応では基質混合液を添加した場合の相乗効果または抑制的な影響をみたのであるが結果は6図に見られるように概して反応速度が低く、NAD-4S, NADP-2S両区とも相乗効果はみられず抑制的影響がみられた。

これは長町、本田(1967<sup>8)</sup>)がヒマ種子のNADP-IDHの活性を glucose-6-phosphate が阻害することを見出した例もあり、各酵素の阻害因子が複雑にからみ合っていることも推測される。何れにしてこの処方による活性度の比較には格別の利点はないようである。

## 要 約

ダイズ、アズキ、インゲンマメ、ササゲ及びエンドウの5種の豆類の新古鑑定の手がかりを得るため、成熟休眠種実の oxidoreductase 系諸酵素活性と試料の新、古や発芽率との関係を比較観察した。なお一部試料については phosphorylase 活性も検定した。

(1) 対象とした酵素の種類は脱水素酵素7種(SDH, NAD-ADH, NAD-MDH, NAD-GDH, NAD-LDH, NADP-IDH及びNADP-G6PDH) peroxidase, cytochrome oxidase 及び starch phosphorylase であった。

(2) 組織切片による組織化学的呈色反応から

a 諸酵素活性の組織内分布は、子葉では維管束、表皮などに強く、幼芽幼根では apical meristem procombium に共通して強い活性が認められた。

b いっぱんに発芽率が低く貯蔵期間の長いものほど諸酵素活性が低下する傾向は認められたが他方では酵素活性の新古逆転の例(特に phosphorylase)も少なくなかった。

(3) 組織磨砕液による resazurin 還元脱色反応による脱水素酵素活性の比較から脱水素酵素群の活性も、発芽率が低く貯蔵期間の長いものが酵素活性が低い傾向は認められたが、この場合にも酵素活性新古逆転の例(特にダイズ子葉)も少なくなかった。

以上から休眠種子の oxidoreductase 系諸酵素や phosphorylase 活性は古くなるほど低下する傾向は示すものの、直ちに新古鑑別発芽率推定の確実鋭敏な手がかりとはなり得ないことを知った。

稿を終えるに当たり、試料入手に便宜をお計らい下さった川西農協、ホクレン農業協同組合連合会及び大平商店に謝意を表します。

## 文 献

- 1) 麻生慶次郎, 名越徹: 農学会報 *№* 272, 91 (1924).
- 2) BAIRD, P. D., MCMASTERS, M. M. and RIST, C. E.: *Cereal Chem.* 27, 508 (1950).
- 3) 福井俊郎: 植物酵素蛋白質研究法(蛋白質, 核酸酵素別冊76:2, 森田雄平ほか編), 共立出版(東京), P421, (1976).
- 4) HORACE, K. B. SAMUEL and MORRIS, H. J.: *Food Technology* 22 (3), 336 (1968).
- 5) MCMASTERS, M. M. EARLE, F. R. and HALL, H. H.: *Cereal Chem.* 54, 451 (1954).
- 6) NACHLAS, M. M., WALKER, D. G. and SELIGMAN, A. M.: *J. Biophys. and Biochem Cytol.* 4, 29, 169, 467, (1958).
- 7) NACHLAS, M. M., CRAWFORD, D. T. GOLDSTEIN, J. P. and SELGMAN, A. M.: *J. Histochem, Cytochem.* 6, 445 (1958).
- 8) 長町健一. 本田幸一郎: 農化 41 (3), 99 (1967).
- 9) 中山包: 農林種子の発芽. 内田老鶴圃新社(東京), P40, 45, 52 (1973).
- 10) 佐藤七郎: 植物学雑誌 66, 277 (1953).
- 11) 田崎忠良, 田口亮平: 実験植物生理生態学実習書, 第6版, 養賢堂(東京). P97, 110 (1975).
- 12) OOTA, Y. YAMAMOTO, Y. and FUJII, R.: *J. Biochem.* 40, 187 (1953).
- 13) 安田貞雄: 種子生産学. 養賢堂(東京) (1948).
- 14) 山本幸男: 植物酵素蛋白質研究法(森田雄平ほか編, 蛋白質, 核酸. 酵素別冊76:2). 共立出版(東京) P301. (1976).